

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/014015

International filing date: 07 December 2004 (07.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 103 60 968.7
Filing date: 24 December 2003 (24.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 14 February 2005 (14.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EPO - DG 1

03. 02. 2005

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:**

103 60 968.7

Anmeldetag:

24. Dezember 2003

Anmelder/Inhaber:AGOWA Gesellschaft für molekularbiologische
Technologie mbH, 12489 Berlin/DE**Bezeichnung:**Verfahren zur Anreicherung nukleinsäurehaltiger
Komplexe**IPC:**

C 07 H, B 01 D, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. Januar 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Schäfer



Erfindungsbeschreibung

- Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anreicherung von nukleinsäurehaltigen Komplexen aus Blut oder anderen biologischen Materialien. Die nukleinsäurehaltigen Komplexe werden nach teilweiser Lyse des Probenmaterials mittels eines Puffers, der Detergentien und Enzyme enthalten kann, an eine feste Oberfläche bestehend aus Copolymeren von Acrylsäure- oder Methacrylsäurederivaten und monomeren Komponenten mit einer Sulfonsäuregruppierung gebunden und die restlichen Bestandteile des Probenmaterials abgetrennt. Dann können die nukleinsäurehaltigen Bestandteile des Probenmaterials unter einer bestimmten Ionenstärke von der Oberfläche abgelöst und die Nukleinsäuren weiter aufgereinigt werden. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung haben die festen Oberflächen magnetische Eigenschaften und die Gestalt von Mikropartikeln mit einem Durchmesser im Bereich von 1-30 Mikrometern.
- Mit der Etablierung Nukleinsäure analytischer Methoden in der Laboratoriumspraxis, insbesondere der klinischen Analytik, haben Methoden zur Nukleinsäureaufreinigung wie zum Beispiel zur Aufreinigung von DNA oder RNA eine rasante technologische Entwicklung durchlaufen. Besonderes Augenmerk gilt vor allem Nukleinsäureisolationsverfahren, die geeignet sind auf automatischen „Liquid Handling“-Systemen appliziert zu werden. Herausragend sind hier Festphasenextraktionskonzepte die Adsorbentien mit magnetischen Eigenschaften nutzen, da durch die mögliche Manipulation dieser Adsorbentien mit magnetischen Feldern ein manuelles Eingreifen in den Extraktionsverlauf umgangen wird und der Prozess damit vollautomatisch gestaltet werden kann.
- Gerade in der klinischen Analytik, etwa der Untersuchung des Major Histocomparability Complexes (MHC, HLA Analytik) wird eine bestimmte Mindestkonzentration von DNA nach der Isolation erwartet, die den Einsatz relativ großer Mengen an Probenmaterial erforderlich macht. Das automatische Extrahieren dieser relativ großen Probenmengen ist jedoch problematisch, da die zur Verfügung stehenden Pipettierroboter nicht in jedem Fall in der Lage sind die erforderlichen Volumina effektiv zu bearbeiten.
- Dem entsprechend wurden Strategien entwickelt vor der eigentlichen Nukleinsäure - Extraktion die nukleinsäurehaltigen Zellen bzw. die nukleinsäurehaltigen Bestandteile des Probenmaterials, insbesondere von Blut, anzureichern.
- Eine dieser Varianten zur Anreicherung nukleinsäurehaltiger Zellbestandteile besteht in der nichtenzymatischen Lyse der Zellen mittels sogenannter Lysepuffer für rote Blutzellen (Red Cell Lysis Buffer, RCB), der Pelletierung der DNA - haltigen Bestandteile des Blutes durch Zentrifugation und dem anschließenden Extrahieren der DNA aus diesem Pellet [Rappoport und Raderecht, Physiologisch-chemisches Praktikum, 7. Auflage 1977, Verlag Volk und Gesundheit, S. 504]. Dieses Verfahren ist nicht sehr automatisierungsfreundlich, da der Zentrifugationsschritt einer durchgehend automatisierten Extraktion von Nukleinsäuren entgegensteht. Die Integration von Zentrifugen in Robotersysteme ist zwar möglich, die Umsetzung ist jedoch außerordentlich kostenintensiv und technologisch schwer zu realisieren.
- Ein anderer methodischer Ansatz nutzt die Affinität spezieller Antikörper gegen DNA - haltige Blutzellen (z.B. CD 4 Zellen). Diese Antikörper, gebunden an Magnetpartikel erlauben eine Aufkonzentrierung von DNA - haltigen Blutzellen und damit eine Verringerung des Volumens, welches in die eigentliche DNA Isolation eingeht. Eine Variante zur Isolation von DNA - haltigen Blutzellen mittels an Magnetpartikel gebundene spezifische Antikörper

5 ist von Hardingham beschrieben [Hardingham et al.; Cancer Research 53 (1993)3455-3458; s. auch Lundeberg and Larsen; Biotechnology Annual Review 1.(1995) 373-401].

Nachteile des angeführten Verfahrens sind einmal der hohe Preis für die eingesetzten Magnetpartikel. Zum anderen versagt dieses Verfahren beim Einsatz von gefrorenen Bluten, wie er in der klinischen Praxis durchaus die Regel ist, da hier durch das Einfrieren und Auftauen des Probenmaterials die Zellen zerstört wurden und die Spezifität der Antikörper nicht mehr zum Tragen kommt.

10 Es konnte überraschender Weise festgestellt werden, dass das Einbringen von festen Phasen die dadurch charakterisiert sind, dass ihre Oberfläche mit Copolymeren aus Acrylsäure oder Acrylsäurederivaten wie Acrylamid, bzw. Methacrylsäurederivaten und sulfonsäuretragenden Monomeren wie Styrensulfonsäure, Vinylsulfonsäure unter einem definierten Verhältnis der beiden Monomerkomponenten in eine Lösung von Blut in der die Zellen des Blutes lysiert oder teilweise lysiert sind, die nukleinsäurehaltigen Bestandteile dieses Lysates wie zum
15 Beispiel Zellkerne an die gepfropften Oberflächen binden und der Überstand abtrennbar ist. Die nukleinsäurehaltigen Zellbestandteile lassen sich nach dem Verwerfen des restlichen Probenmaterials in einem kleinen Volumen einer wässrigen Salzlösung mit definierter Ionenstärke wieder eluieren. Damit wird erreicht, dass die sich im Probenmaterial befindlichen nukleinsäurehaltigen Zellbestandteile aufkonzentriert und von den restlichen
20 Bestandteilen des biologischen Materials abgetrennt werden sowie das in die nachfolgende Extraktion der Nukleinsäuren eingehende Volumen drastisch reduziert wird.

Die Herstellung der zur erfindungsgemäßen Anreicherung notwendigen Adsorbentien kann durch die dem Fachmann hinlänglich bekannten Pfropfungsverfahren wie etwa dem
25 Aufbringen der Monomergemische auf mittels Peroxidradikalen aktivierten Oberflächen erfolgen.

So lassen sich beispielsweise mit Dialdehyden vernetzte Polyvinylalkoholderivate mittels konzentrierter Lösung von Wasserstoffperoxid aktivieren [Bates and Shanks; J. Macromol. Science – Chem. A14 (1980)137-151, Bolto et al., J. Appl. Polym. Sci. 2 (1978) 1977].

30 Ebenso ist eine Aktivierung der Basisoberfläche durch partielle Oxidation mit Cer(IV)ammoniumsulfat [Mukopadhyay et al., J. Polym. Sci. A-1, 7 (1969) 2079] denkbar. Andere Aktivierungsverfahren sind die photochemische Aktivierung der Oberfläche durch Sensibilisatoren wie Benzophenon oder Methylenblau.

Die Adsorptionseigenschaften der beschriebenen gepfropften Oberflächen lassen sich durch das Einstellen des Verhältnisses der beiden verwendeten Monomere definieren. Weiterhin können die Oberflächeneigenschaften der erfindungsgemäßen Adsorbentien durch die zusätzliche Verwendung von weiteren Monomerkomponenten mit einer polymerisierbaren Doppelbindung beeinflusst werden. So kann man beispielsweise durch den Einsatz von Vinylacetat und dessen Hydrolyse nach der Polymerisation das Benetzungsverhalten der
40 erfindungsgemäßen Adsorbentien verbessern.

Zu Anreicherung der nukleinsäurehaltigen Zellbestandteile werden die erfindungsgemäßen Adsorbentien zu einem auf enzymatischem, etwa durch die Behandlung mit Proteinase K, die dem Fachmann hinlänglich bekannt ist und/oder nichtenzymatischen Wege, etwa des
45 Einsatzes von Detergentien und eines osmotischen Schocks, gewonnenen Lysates eines biologischen Materials, besonders Blut gegeben. Nach einer Bindungszeit der nukleinsäurehaltigen Zellbestandteile von 1-10 Minuten, vorzugsweise 2-5 Minuten werden die festen Adsorbentien mit den nukleinsäurehaltigen Zellbestandteilen abgetrennt. Die nukleinsäurehaltige Komplexe lassen sich dann mit Hilfe wässriger Lösungen von Salzen mit
50 definierter Ionenstärke wieder abtrennen und der eigentlichen Aufreinigung der Nukleinsäuren zuführen.

Das Volumen der zur Ablösung der nukleinsäurehaltigen Zellbestandteile benötigten Lösung ist deutlich geringer als das Ausgangsvolumen der biologischen Probe, so dass eine Konzentration der aufzureinigenden Nukleinsäuren erreicht wird und die Extraktion in kleinen Volumina mit Robotern erfolgen kann.

Die festen Adsorbentien können als loses Pulver oder als modifiziertes Filtermaterial zum Einsatz gelangen. Beispielhaft ist die Verwendung der beschriebenen Adsorbentien in sogenannten „Spin columns“, kleinen Chromatographiesäulen für die Handhabung in Tischzentrifugen.

In einer besonderen Ausführungsform dieser Erfindung bestehen die Adsorbentien zur Anreicherung des nukleinsäurehaltigen Zellmaterials aus magnetischen Mikropartikeln mit den erfindungsgemäßen Oberflächeneigenschaften.

Nukleinsäurehaltige Zellbestandteile im Sinne dieser Erfindung können Zellkerne und andere nukleinsäurehaltigen Organellen wie Mitochondrien oder Chloroplasten sowie nukleinsäurehaltige Proteinkomplexe oder Viren u. a. sein.

Biologische Materialien im Sinne dieser Erfindung können Körperflüssigkeiten sein wie Blut, Urin, Cerebrospinalflüssigkeit. Weiterhin können zu diesen biologischen Materialien gehören Kulturen von Mikroorganismen, zellhaltige Materialien wie Gewebe oder Bodenproben, Bestandteile von Pflanzen oder anderen Organismen.

Die auf die erfindungsgemäßen Partikel aufgepfropften Copolymere bestehen aus Acrylsäure- bzw. Methacrylsäurederivaten insbesondere Acrylamid und Vinylsulfonsäuremonomeren, insbesondere Styrensulfonsäure in einem Monomerverhältnis zwischen 50% und 10% des Sulfonsäurederivates, besonders zwischen 10 und 25%.

Die Trägermaterialien, auf die Monomere gepfropft werden können anorganische oder organische Materialien sein, die eine Pfropfreaktion auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften gestatten. Dazu gehören z.B. Polystyren, Polysulfone oder modifizierte Kieselgele. Besonders eignen sich Hydroxylgruppen tragende Polymere wie Zellulose, ganz besonders Polyvinylalkoholderivate.

Die Erfindung soll nun anhand einiger Beispiele illustriert werden, ohne sie aber auf diese Beispiele zu beschränken.

Beispiel 1

1 g magnetischer Mikropartikel bestehend aus mit Glutardialdehyd vernetztem Polyvinylalkohol werden im Verlauf von einer Stunde mit 10ml 30%igem Wasserstoffperoxid aktiviert. Die Partikel werden aus der Suspension abgetrennt und mit Wasser peroxidfrei gewaschen.

Dann gibt man diese Partikel zu einer Lösung von 1,1g Acrylamid und 0,5g Styrensulfonsäure die mit Natronlauge auf pH 7 gebracht wurde. Nach der Zugabe von 40mg Eisen(II)sulfat rührt man 1 Stund bei Raumtemperatur.

Die Partikel werden dann abgesaugt und mit Wasser von restlichem Monomer und nicht gepfropften Polymer befreit und sind für die Anreicherung von nukleinsäurehaltigem Zellmaterial bereit.

Beispiel 2

- 10 mg der unter Beispiel 1 hergestellten Magnetpartikel werden in eine Mischung aus 2 ml Blut und 4 ml eines Lysepuffers bestehend aus einer 2,5M Lösung von Saccharose, die 1% Triton X100 enthält, gegeben. Die Lösung wird innig gemischt, um die Magnetpartikel zu verteilen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann trennt man die Partikel durch
- 5 Anlegen eines Permanentmagneten an die Gefäßwand ab und verwirft die Flüssigkeit im Gefäß, wobei man darauf achtet keine Magnetpartikel zu verlieren.
- Die Partikel mit den gebundenen DNA - haltigen Zellbestandteilen werden nun in 200 μ l 1,5 M NaCl-Lösung resuspendiert. Wiederum werden die Magnetpartikel durch Anlegen eines äußeren Magnetfeldes an der Gefäßwand gesammelt. Der Überstand kann nun weiteren
- 10 Methoden zur Aufreinigung von DNA zugeführt werden.

Patentansprüche

Anspruch 1

Verfahren zur Anreicherung von nukleinsäurehaltigen Komplexen, dadurch gekennzeichnet, dass feste Adsorbentien mit Oberflächen bestehend aus Copolymeren von Vinylsulfonsäurederivaten und einem Trägerpolymer in ein lysiertes oder teilweise lysiertes biologisches Material eingebracht werden, die nukleinsäurehaltigen Komplexe an das eingebrachte Adsorbens binden, das restliche biologische Material von dem Adsorbens abgetrennt und die an das Adsorbens gebundenen nukleinsäurehaltigen Komplexe wieder eluiert werden.

Anspruch 2

Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Vinylsulfonsäurederivate Styrensulfonsäure verwendet wird.

Anspruch 3

Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Trägerpolymer Acrylsäure oder Methacrylsäure oder eines ihre Derivate, insbesondere Acrylamid bzw. Methacrylamid verwendet werden.

Anspruch 4

Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Copolymere durch Pfpfopolymerisation auf die Oberfläche des Adsorbens aufgebracht werden.

Anspruch 5

Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt der Vinylsulfonsäurekomponente im Reaktionsgemisch bei der Pfpfopolymerisation zwischen 10 und 50 Masseprozent, besonders zwischen 10 und 25 Masseprozent der Gesamtmonomermasse beträgt.

Anspruch 6

Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als biologisches Material Blut und andere Körperflüssigkeiten wie Urin, Serum oder Plasma aber auch Zellsuspensionen von Mikroorganismen und Aufschlüsse von Pflanzen zum Einsatz kommen.

Anspruch 7

Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als nukleinsäurehaltige Komplexe Zellkerne, Mitochondrien, Chloroplasten, nukleinsäurehaltige Protein-Komplexe, Virus-Partikel und anderes an die Adsorbentien binden

Anspruch 8

Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuren in den nukleinsäurehaltigen Komplexen sowohl Desoxyribonukleinsäuren als auch Ribonukleinsäuren sind.

Anspruch 9

Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die an das Adsorbens gebundenen nukleinsäurehaltigen Komplexen durch kleine Volumina von wässrigen Salzlösungen definierter Ionenstärke abgelöst werden können, wobei insbesondere Lösungen von Natrium- oder Kaliumchlorid mit einer Konzentration von 0,5 bis 3,5 molar insbesondere zwischen 1 und 2 molar zum Einsatz kommen.

Anspruch 10

Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die eingesetzten Adsorbentien über magnetische Eigenschaften verfügen, die sie durch Anlegen externer magnetischer Felder mechanisch manipulierbar machen.

Zusammenfassung:

- Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Abtrennung und Anreicherung von nukleinsäurehaltigen Komplexen aus Blut oder anderen biologischen Materialien. Die
- 5 nukleinsäurehaltigen Komplexe werden nach teilweiser Lyse des Probenmaterials mittels eines Puffers, der Detergentien und Enzyme enthalten kann, an eine feste Oberfläche bestehend aus Copolymeren von Acrylsäure- oder Methacrylsäurederivaten und monomeren
- 10 Komponenten mit einer Sulfonsäuregruppierung gebunden und die restlichen Bestandteile des Probenmaterials abgetrennt. Dann können die nukleinsäurehaltigen Bestandteile des
- Probenmaterials unter einer bestimmten Ionenstärke von der Oberfläche abgelöst und die Nukleinsäuren weiter aufgereinigt werden. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung haben die festen Oberflächen magnetische Eigenschaften und die Gestalt von Mikropartikeln mit einem Durchmesser im Bereich von 1-30 Mikrometern.